

UNIVERSITE PARIS - SUD

FACULTE DE MEDECINE KREMLIN-BICETRE

1971

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(diplôme d'Etat)

par

Pierre JOUANNET

né le 31 mars 1942 à Béziers

Présentée et soutenue publiquement le 1971

MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTION INHIBITRICE DE LA FECONDATION
PAR UN SERUM ANTISPERME CHEZ LE LAPIN.

Président du Jury de Thèse : Monsieur le Professeur DUTREIX

U N I V E R S I T E P A R I S - S U D

FACULTE DE MEDECINE KREMLIN-BICETRE

T H E S E

pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(diplôme d'Etat)

par

Pierre JOUANNET

né le 31 mars 1942 à Béziers

Présentée et soutenue publiquement le 1971

MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTION INHIBITRICE DE LA FECONDATION
PAR UN SERUM ANTISPERME CHEZ LE LAPIN.

Président du Jury de Thèse : Monsieur le Professeur DUTREIX



A Monsieur le Professeur DUTREIX

qui me fait l'honneur de présider le jury
de cette thèse.

A Monsieur le Président de l'Université

qui se fait l'honneur de présenter la loi
de cette classe.



A Monsieur le Professeur THIBAUT

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris
Chef du Département de Physiologie animale de
l'Institut National de la Recherche Agronomique

En m'accueillant dans son laboratoire de Jouy-en-Josas
il m'a permis de découvrir et d'aimer la recherche.
Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

A tous mes camarades de la Station de Physiologie animale
du C.N.R.Z.

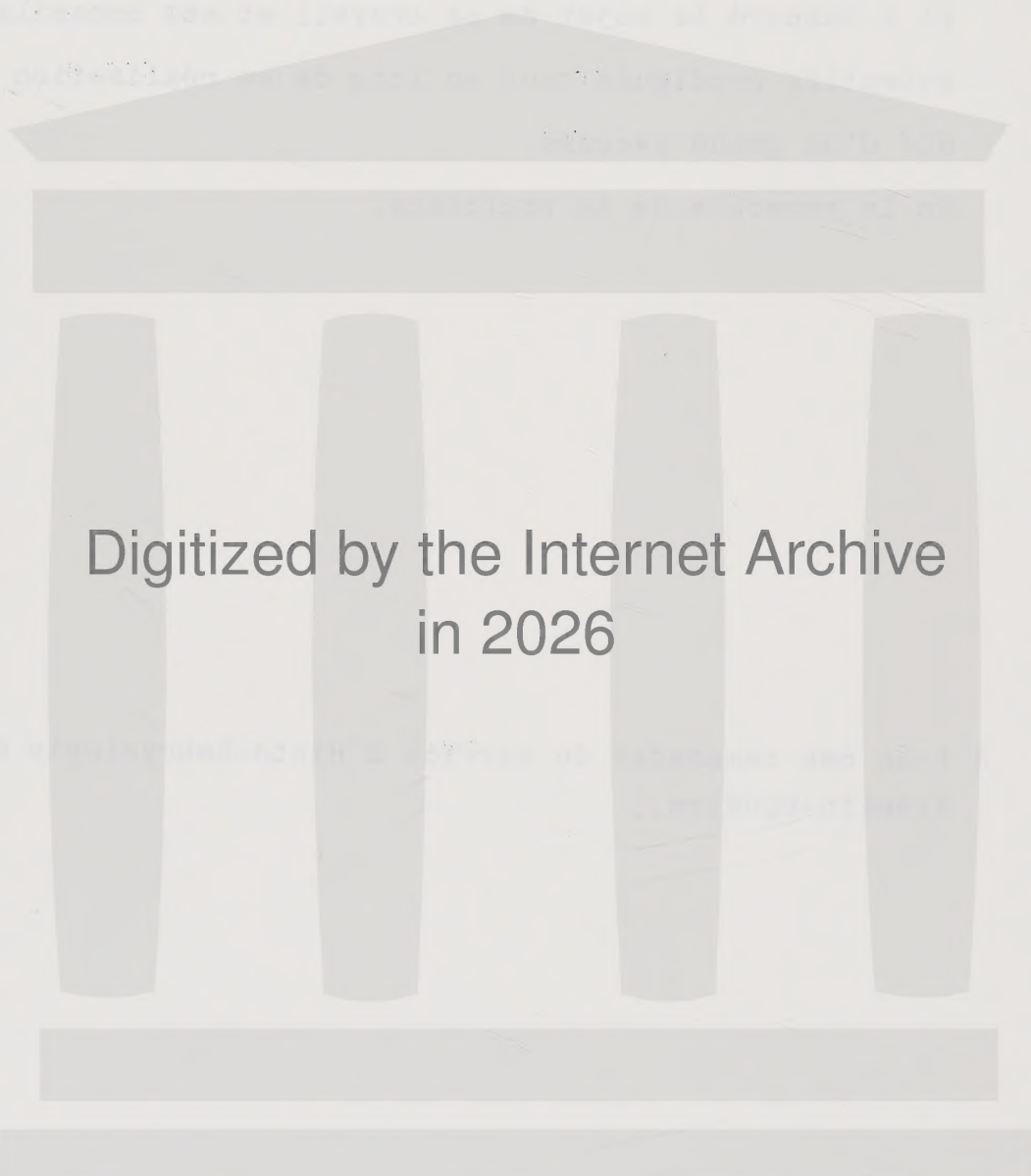
Par leurs explications patientes, leurs conseils et leur
aide, ils ont largement contribué à me donner les quelques
connaissances que je possède.

A Monsieur le Professeur Agrégé DAVID

Il a inspiré le sujet de ce travail et ses conseils attentifs prodigués tout au long de sa réalisation m'ont été d'un grand secours.

Je le remercie de sa confiance.

A tous mes camarades du service d'Histo-Embryologie du CHU Kremlin-Bicêtre.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556004_0030

Je tiens à remercier plus particulièrement

Christine BARON

Jean-Pierre BISSON

Danièle CHERON (Jouy-en-Josas)

Aline SOLARI (Jouy-en-Josas)

Jean-Pierre TURPAUD

qui, à des titres divers m'ont apporté leur aide pour la
réalisation de ce travail ; qu'ils trouvent ici
l'expression de mon amitié.

MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTION INHIBITRICE
DE LA FECONDATION PAR UN SERUM ANTISPERME
CHEZ LE LAPIN

I N T R O D U C T I O N

Les rapports des processus immunologiques avec ceux de la reproduction sont à ce point nombreux que la nécessité s'est fait sentir, il y a peu, d'un terme nouveau "l'immuno-reproduction" pour recouvrir un domaine commun déjà très vaste.

La raison fondamentale de ce développement tient à la haute antigénicité des gamètes et tout spécialement du spermatozoïde. Cette donnée essentielle a été établie dès le début du siècle par METCHNIKOFF d'une part et LANDSTEINER d'autre part.

Cette mise en évidence fut à l'origine d'une efflorescence d'études expérimentales menées, pour la plupart, avec l'intention affichée ou transparente de contrôler la fertilité par un moyen immunologique. TYLER relevait en 1961 55 travaux sur le sujet. Le nombre de publications qui sont venues s'ajouter à cette liste depuis cette date, témoigne qu'il n'y a pas eu perte d'intérêt dans les dernières années mais permet également de supputer à priori qu'une solution satisfaisante n'a pas encore été trouvée.

Ces travaux se répartissent en deux groupes d'importance numérique très inégale. La plupart reposent sur une immunisation active de la femelle contre les spermatozoïdes homologues ou hétérologues. Bien souvent, mais non constamment, ils aboutissent au but recherché, à savoir une stérilité temporaire. Mais, à ne

considérer que les succès, ils souffrent deux objections d'importance : -d'une part, d'un point de vue pratique la transposition d'une telle méthode à l'espèce humaine n'est pas sans poser des problèmes importants,

- d'autre part, d'un point de vue théorique il est difficile d'établir très exactement le point d'action de l'immunisation ; il est encore plus difficile de faire la part dans le mécanisme d'action de l'immunité cellulaire et de l'immunité humorale.

L'immunisation passive a au moins l'avantage d'éliminer la réponse cellulaire. Elle aurait aussi celui, en cas d'application pratique, d'être la plus simple et moins dangereuse surtout si l'on envisage une utilisation locale génitale.

Devant l'évidence de ces avantages on ne peut que s'étonner de la place très modeste que les expérimentateurs ont fait jusqu'à présent à cette voie d'abord pourtant logique. Mais cette relative pénurie ne traduirait t-elle pas une inefficacité ?

Les quelques travaux publiés jusqu'à présent et dont nous analyserons ultérieurement les résultats sont loin d'être négatifs.

L'action in vitro d'un sérum antisperme sur les spermatozoïdes avant la fécondation semble inhiber les capacités fécondantes du gamète.

Malheureusement un seul travail, relativement partiel, a exploré l'action de l'immunsérum in vivo, c'est-à-dire déposé dans le vagin avant l'accouplement. Le succès dont il fait état, étant donné les conditions expérimentales, méritait vérification.

C'est ce qui nous a conduit à entreprendre ce travail destiné à étudier les conséquences sur la fécondation de l'action d'un sérum homologue antisperme de Lapin en l'utilisant selon deux modalités :

1) In vitro : l'immunsérum est incubé avec les spermatozoïdes préalablement à l'insémination.

2) In vivo : l'immunsérum est introduit directement dans le vagin de la Lapine avant un accouplement normal.

Il est important de préciser que nous avons utilisé l'action cytotoxique de l'immunsérum par adjonction systématique de complément. On peut souligner qu'aucun travail antérieur ne s'était placé dans ces conditions.

Nous exposerons notre travail selon le plan suivant :

P L A N

<u>MATERIEL et METHODES</u>	p. 4
- Obtention des sérums	p. 4
- Tests d'activité des sérums	p. 4
- Traitement du sperme et insémination	p. 8
Expérience I-Action <u>in vitro</u> de l'immunsérum	p. 9
Expérience II- Action <u>in vivo</u> de l'immunsérum ...	p. 10
- Contrôle de la fécondation	p. 11
 <u>RESULTATS</u>	p. 13
- Tests d'activité des sérums	p. 13
- Influence des sérums sur la fécondation	p. 16
 <u>ANALYSE DES TRAVAUX ANTERIEURS</u>	p. 19
 <u>DISCUSSION</u>	p. 32
- Analyse des résultats de la série témoin	p. 32
- Discussion des résultats de la série expérimentale..	p. 34
1) Fraction active du sérum	p. 34
2) Niveau d'action de l'immunsérum	p. 39
 <u>CONCLUSION</u>	p. 42
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p. 45

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

M A T E R I E L et M E T H O D E S

Nous avons fait deux séries d'expériences :

1) Dans la première nous avons fait agir un immunsérum antisperme sur les spermatozoïdes in vitro avant l'insémination. Nous avons comparé son action à celle d'un sérum normal utilisé dans les mêmes conditions et réalisant une série témoin.

2) Dans la seconde nous avons introduit l'immunsérum dans le vagin avant l'accouplement. La même expérience réalisée avec du sérum normal constituant ici encore une série témoin.

Dans les deux cas il s'agissait d'un même immunsérum homologue ; de plus les tests de contrôle de fécondité ont été les mêmes.

I.- OBTENTION DES SERUMS

1) Le sérum normal est recueilli par ponction intracardiaque sur des Lapines vierges.

2) Le sérum immun est produit par immunisation de Lapines avec du sperme homologue.

Les éjaculats de deux ou trois Lapins mâles sont mélangés.

5 Lapines ont été utilisées, chacune reçoit 0,3ml du mélange des spermes auquel est ajouté de l'adjuvant complet de Freund, la dose est répartie en deux ou trois injections sous-cutanées sur le dos et les cuisses.

Les injections ont été faites selon les modalités suivantes :

- 1ère semaine : 0,3 ml de sperme + 1 ml d'adjuvant de Freund
- 2ème semaine : 0,3 ml de sperme
- 3ème semaine : 0,3 ml de sperme + 1 ml d'adjuvant de Freund
- 4ème semaine : 0,3 ml de sperme

L'intervalle entre chaque injection a été d'une semaine.

15 jours après la dernière injection la Lapine est saignée par ponction cardiaque.

Le sérum est chauffé à 56° pendant 30 minutes puis conservé à -35°.

Nous avons utilisé dans notre expérience un pool réunissant le sérum des cinq Lapines immunisées. Ce pool constitué à partie égale de chaque sérum est réparti en petites quantités et conservé à -35°. On ne dégèle à chaque manipulation que la quantité nécessaire à l'expérience.

II.- TEST D'ACTIVITE DES SERUMS

L'action du pool sur les spermatozoïdes est appréciée par différents tests :

1) Une étude morphologique en microscopie optique sur des frottis de spermatozoïdes incubés in vitro avec le pool par comparaison avec des spermatozoïdes fraîchement éjaculés. Les frottis sont colorés par l'hémalun-éosine.

2) Test de cytotoxicité. Il a été utilisé un test basé sur la coloration élective des cellules mortes par la nigrosine-éosine. Ces colorants ainsi que d'autres comme le bleu opale, le trypan bleu, ont la propriété de colorer électivement les cellules mortes ; ils ont d'ailleurs été utilisés depuis 1942 (EASLEY, MAYER, BOGART, 1942) par de nombreux chercheurs comme méthode d'appréciation générale de la "vitalité" du sperme et sont à la base d'un examen clinique maintenant courant.

Cette action des colorants vitaux a été employée pour mettre au point une méthode de détection indirecte des anticorps cytotoxiques leucocytaires (ENGELFRIET et BRITTEN, 1965).

HAMERLYNCK et RUMKE (1968) ont modifié cette méthode pour détecter la présence d'anticorps cytotoxiques par pénétration de trypan bleu dans les spermatozoïdes.

Ici, s'inspirant de la méthode d'HAMERLYNCK et RUMKE, la nigrosine-éosine a été employée selon la technique suivante :

Le sperme testé est ramené à une dilution de 50×10^6 spermatozoïdes par ml dans une solution physiologique (Baker ou Locke*). On calcule la mortalité de base des spermatozoïdes

* Solution de Baker

- Glucose 3 g
- Chlorure de sodium 0,20 g
- Phosphate de sodium disodique 0,6 g
- Phosphate de potassium monopotassique.. 0,01 g
- Eau 100 ml

Solution de Locke

- Chlorure de sodium 8,5 g
- Chlorure de potassium 0,42 g
- Carbonate de sodium 0,20 g
- D Glucose 2,5 g
- Chlorure de calcium 0,25 g
- Eau 1000 ml

(incubation de 3 gouttes de la solution + 3 gouttes de nigrosine-éosine pendant 5 minutes à 37°) correspondant au pourcentage des spermatozoïdes ayant pris le colorant. Parallèlement on incube les spermatozoïdes avec le pool à des dilutions croissantes selon le schéma suivant :

Dilution

1 : 2 gouttes de sérum pur

1/2 : 2 gouttes de sérum pur + 2 gouttes de Baker

1/4 : 2 gouttes dilution 1/2 + 2 gouttes de Baker, etc...

Chaque tube reçoit 2 gouttes de la solution de spermatozoïdes à 50 millions et une goutte de complément lyophilisé de Cobaye (Institut Pasteur³) préparé extemporané~~ment~~ment. Le mélange ainsi obtenu est maintenu à 37° pendant 25 minutes.

On ajoute alors 3 gouttes de nigrosine-éosine et on incube à nouveau 5 minutes à 37°. On examine une goutte de la solution entre lame et lamelle.

On compte comme mort tout spermatozoïde dont la tête a partiellement ou totalement pris le colorant.

La lecture est faite par deux observateurs qui commencent à chaque extrémité de la série de tubes (sérum pur et dilution au 1/32768°).

La lecture simultanée par deux observateurs a pour intérêt de réduire de manière appréciable le temps qui sépare la fin de l'incubation de la série, commune à tous les tubes, et le moment de la lecture de chaque dilution. On compte en effet de 120 à 170 spermatozoïdes pour chaque dilution, et cette manipulation qui demande soin et attention est assez longue pour les

16 tubes de la série. Un autre facteur est à considérer pour la précision et la fidélité du test : la qualité du milieu de dilution et les qualités d'incubation ; la mesure reposant sur l'appréciation de la mortalité des spermatozoïdes après action des anticorps. Il est nécessaire que le milieu d'incubation ne soit pas toxique, ou que la toxicité relative soit faible et constante au cours du test et d'un test à l'autre. Il faut donc utiliser le milieu le plus favorable à la survie des spermatozoïdes. Nous avons utilisé la solution de Baker et la solution de Locke, cette dernière constitue finalement un meilleur milieu. Le pH est aussi très important, EMMENS (1947) a montré que de faibles variations de pH dans le liquide de dilution, ont un effet nocif sur la survie des spermatozoïdes.

Enfin il existe des variations individuelles d'un éjaculat à l'autre c'est pourquoi la cytotoxicité doit être appréciée à partir de la mortalité de base qui varie elle-même dans des limites importantes (4 à 22 % pour un Lapin, dans notre expérience).

3) Immunodiffusion . La composition du pool en anticorps antisperme a été étudiée par immunodiffusion sur acétate de cellulose selon la méthode et le matériel de Millipore*.

III.- TRAITEMENT DU SPERME ET INSEMINATION

Les animaux utilisés pour les inséminations sont des Lapines pubères de races différentes, certaines d'entre elles ayant déjà été gestantes une fois.

EXPERIENCE I, ACTION IN VITRO DE L'IMMUNSERUM

- Recueil et appréciation du sperme

Le sperme est recueilli par un vagin artificiel. On apprécie la mobilité par examen d'une goutte entre lame et lamelle ainsi que la mortalité de base, selon le procédé décrit plus haut.

- Traitement du sperme

50×10^6 spermatozoïdes sont mélangés à 0,3 ml de pool et 3 gouttes de complément puis incubés pendant 20 minutes à 37°.

Le mélange est introduit immédiatement après incubation dans le vagin d'une Lapine dont on a apprécié les chaleurs par la couleur de la vulve. On ne retient pour l'expérience que les Lapines dont la vulve est turgescente et rouge franc.

Le temps total écoulé entre la collecte de spermatozoïdes et l'insémination est de 30 à 35 minutes.

Après l'insémination, on apprécie la vitalité du sperme sur une goutte restant au fond du tube d'incubation après coloration par la nigrosine-éosine.

- Technique d'insémination

On utilise un tube de verre érodé à la flamme à une extrémité et avec une tétine de caoutchouc à l'autre. Ce tube présente une coudure de 30° environ à 5 cm de son extrémité.

La Lapine est maintenue la tête en bas entre les genoux. On introduit le tube regardant vers le dos et quand la coudure arrive au niveau de la vulve, on fait subir une rotation de 180° au tube et on enfonce doucement en cherchant le chemin. On peut

ainsi pénétrer jusqu'au fond du vagin que l'on perçoit très bien. On introduit alors doucement le mélange spermatozoïdes-sérum et on retire le tube avec précaution. Nous n'avons jamais constaté de perte au niveau de la vulve.

Après insémination artificielle, la Lapine reçoit par voie intra-veineuse une dose ovulante d'HCG (50 U.I.) (Endopancrine^{*}). 5 Lapines ont été inséminées selon ce mode avec des spermes provenant de 5 mâles différents. Dans chaque cas, une expérience témoin a été faite en même temps, dans laquelle l'immunsérum était remplacé par un sérum normal de Lapin.

Nous avons ainsi pour cette première expérience une série expérimentale de 5 Lapines et une série témoin regroupant le même nombre.

EXPERIENCE II, ACTION IN VIVO DE L'IMMUNSERUM

Pour reproduire les conditions les plus proches possibles de l'expérience in vitro (0,3 ml de sérum et 3 gouttes de complément pour 50×10^6 de spermatozoïdes) nous avons évalué la quantité moyenne de spermatozoïdes présents dans les éjaculats des Lapins de notre élevage. Trouvant des valeurs assez variables d'un Lapin à l'autre et d'un éjaculat à l'autre, nous avons pris dans un premier temps la quantité de sérum et de complément correspondant à une valeur égale ou supérieure au plus grand nombre de spermatozoïdes rencontrés dans un éjaculat.

Le volume introduit dans le vagin étant de ce fait très important, plus de 3,5 ml, on a ensuite réduit la quantité de sérum et de complément : 1 ml + 9 gouttes de complément.

On choisit une Lapine acceptant le mâle et on introduit le mélange sérum-complément selon la technique décrite plus haut. La Lapine est gardée verticalement quelques instants et accouplée à un mâle dans les minutes qui suivent. Elle reçoit de plus, 50 U.I. d'HCG par voie intra-veineuse.

Si le sérum est bien déposé au fond du vagin, il n'y a pas de pertes liquidienne par la vulve que ce soit avant ou après l'accouplement.

Dans cette expérience comme dans la précédente, on a comparé l'action d'un immunsérum et d'un sérum normal de Lapin dans des conditions expérimentales identiques.

Nous avons utilisé autant que possible un mâle différent à chaque fois dans des conditions comparables.

Nous avons donc pour cette deuxième expérience une série expérimentale de 7 Lapines et une série témoin de 7 Lapines.

IV.- CONTROLE DE LA FECONDATION

Les animaux sont tués 28 à 32 heures après l'insémination. A ce moment, les oeufs normalement fécondés sont au stade 4 cellules (GREGORY, 1934).

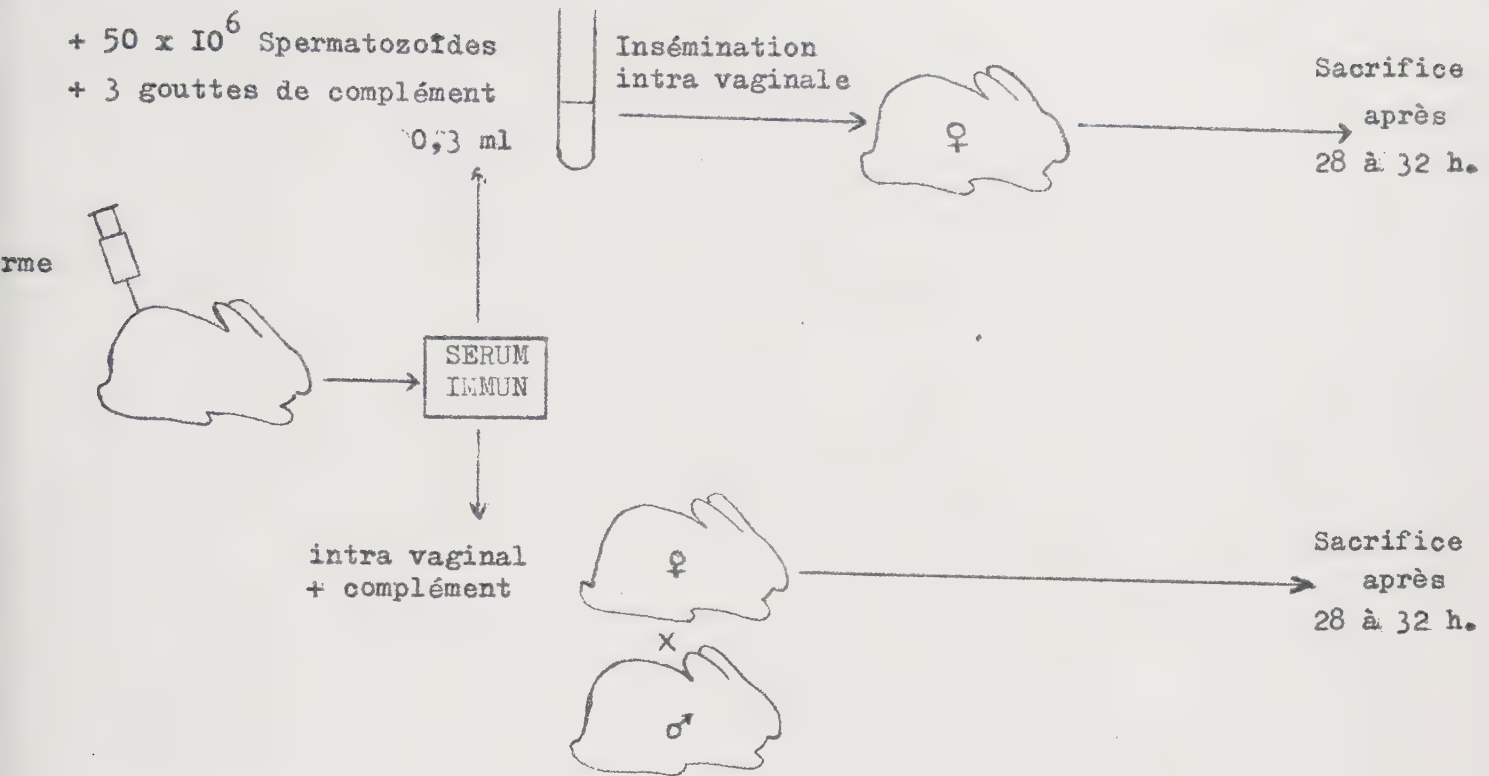
Le tractus génital est prélevé et disséqué. On compte le nombre de points d'ovulation sur chaque ovaire et on sépare trompe et utérus.

Les trompes sont perfusées avec lcc d'une solution physiologique au dessus d'un verre de montre.

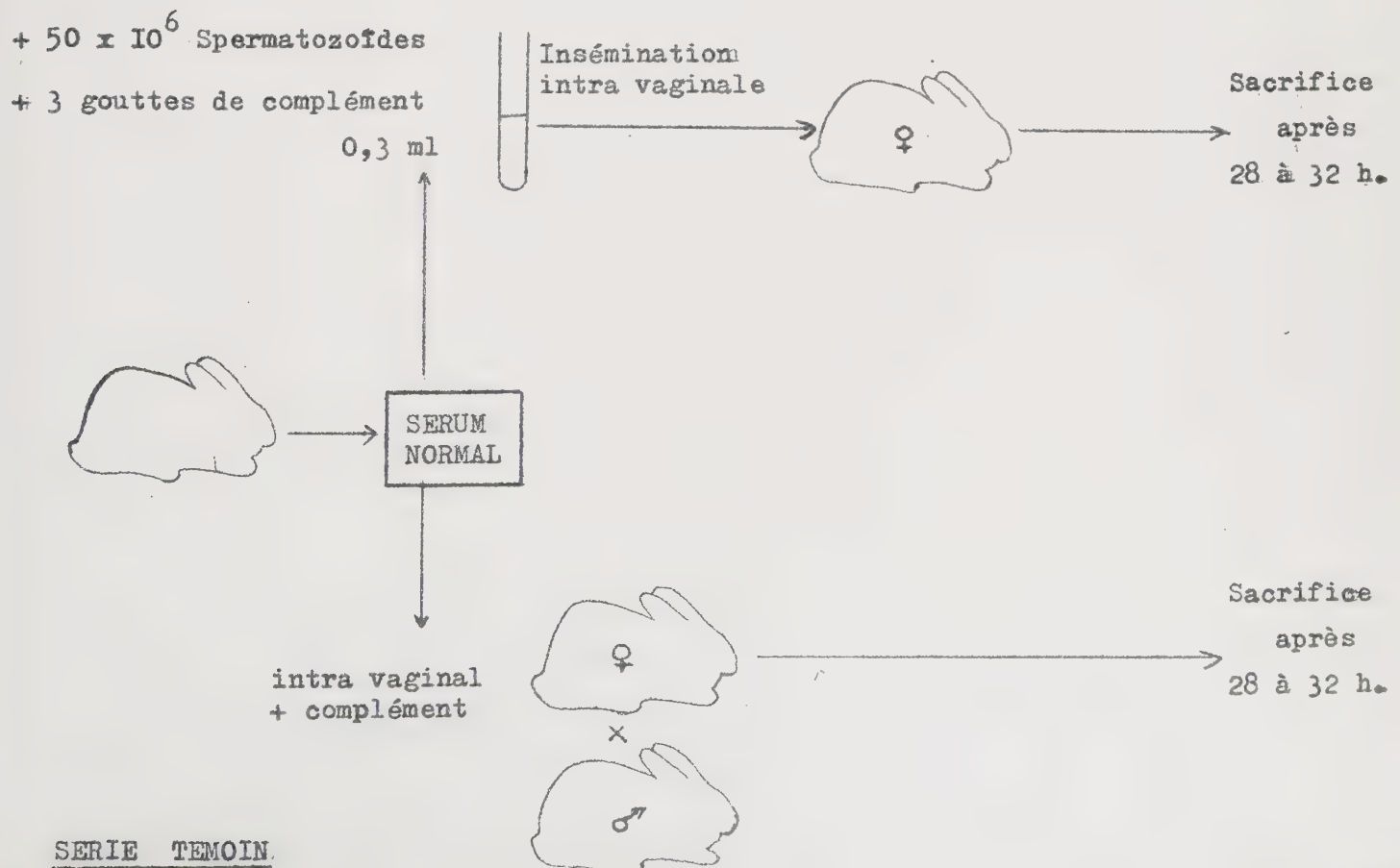
Les oeufs sont regardés à la loupe binoculaire. On tient pour fécondé un oeuf s'étant divisé normalement.

Les oeufs sont ensuite fixés à la solution de Bouin Hollande coupés à 6 ou 10 microns d'épaisseur puis colorés à l'hématoxyline ou à l'hémalun-éosine afin de contrôler la fécondation et de rechercher la présence éventuelle de spermatozoïdes dans le voisinage des oeufs. Les cornes utérines sont aussi perfusées avec lcc de solution physiologique. Les perfusats des trompes et des cornes sont centrifugés à 4000 tours/minute pendant 20 minutes, et le culot étalé sur lame est examiné à la recherche des spermatozoïdes.

SCHEMA EXPERIMENTAL



SERIE EXPERIMENTALE



SERIE TEMOIN

R E S U L T A T S

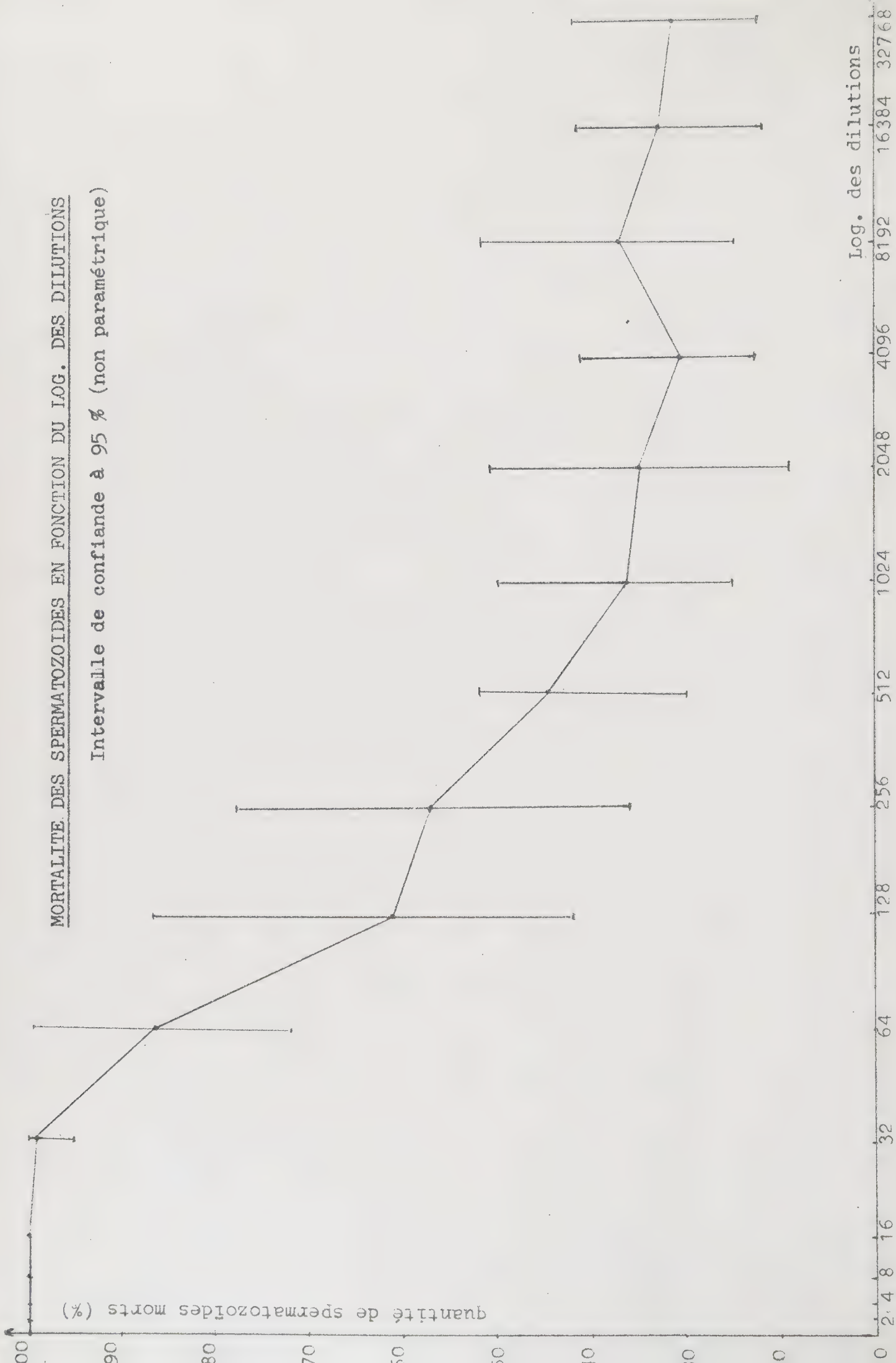
Tableau I

RESULTATS DU TEST DE CYTOTOXICITE (% de spermatozoïdes morts)

Lapin n°	sperme n°	mortalité de base (%)	dilution du sérum															
			1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16384	1/32768
G	1	5	100	100	100	100	100	100	100	56.7	79.2	17	15.4	14.5	19.4	10	14	11.4
B	2	16	100	100	100	100	100	100	99	60.7	44.2	44.2	43.4	53.6	41.4	48.1	42.2	37.3
D	3	9	100	100	100	100	100	100	44.6	22.2	25.9	27.2	14.8	15.3	17.7	12.8	17.7	13.5
D	4	22	100	100	100	100	100	100	90	42.7	37.3	48.7	36.1	45	44.5	49.3	44.7	51.8
E	5	21	100	100	100	100	100	100	98.8	70.9	60.5	68.6	59.3	55.1	40.5	50.6	43	36.7
H	6		100	100	100	100	100	100	57.1	96	84.9	53.3	40.1	26	34.6	52.8	35.8	46.9
F	7	4	100	100	1000	100	100	100	100	87.6	87.5	50.4	42.	47.6	27.6	49.6	32.3	41.3
C	8	10	100	100	99	100	100	95.3	98	52.3	30	49	39.2	23.8	30	24.3	39.8	30
I	9	4	100	100	100	100	100	100	100	68	67	-	-	-	-	-	-	-
Moyenne		11,4	100	100	100	100	100	99.5	86.6	61.9	57.4	44.8	36.3	35.1	32.0	37.2	33.7	33.6

MORTALITE DES SPERMATOZOIDES EN FONCTION DU LOG. DES DILUTIONS

Intervalle de confiance à 95 % (non paramétrique)



R E S U L T A T S

I.- TESTS D'ACTIVITE DES SERÜMS

1) Morphologie

L'incubation de spermatozoïdes éjaculés de Lapin avec de l'antisérum et du complément provoque la mort des spermatozoïdes comme nous le verrons mais sans modifications morphologiques apparentes en microscopie optique : en particulier, nous n'avons pas observé d'image de lyse (voir photo).

2) Test de cytotoxicité

Le pool des sérums utilisé dans l'expérience a été testé avec 9 spermes différents provenant des mêmes mâles que ceux utilisés pour les inséminations.

Le pourcentage des spermatozoïdes morts pour chaque dilution du sérum est porté sur le tableau I. Une moyenne pour chaque est portée sur le graphique I. La courbe ainsi obtenue mesure le pouvoir cytotoxique du pool.

Il en ressort que la mortalité est constamment de 100 % jusqu'à une dilution de $1/32^{\circ}$. La mortalité est encore de 61,9 % à une dilution de $1/128^{\circ}$, c'est-à-dire encore supérieure de 50 % à la mortalité de base moyenne (11,4 %).

A partir de la dilution $1/512^{\circ}$, la courbe suit un plateau ; on peut dire qu'à ce moment l'activité de l'immunsérum est nulle. Comment la différence de niveau par rapport à la mortalité de base peut-elle s'expliquer ?

On peut d'abord remarquer que pour certains spermés (tableau I) tels les spermés 1 et 3, on arrive à un niveau très proche de la mortalité spontanée du départ. Il semble que les chiffres relativement importants obtenus avec d'autres spermés pour des fortes dilutions de sérum, puissent être attribués en partie à la technique (spermé 4 et 7) et que l'on devrait obtenir des résultats plus homogènes.

Par exemple : Pour le Lapin, l'utilisation du Locke comme milieu de dilution nous semble donner de meilleurs résultats (spermés 1, 2 et 3) que le Baker.

D'autre part il doit être remarqué que le test est soumis à un certain degré de variation du fait qu'un des facteurs (la vitalité des spermatozoïdes) n'est pas constant. On observe en effet des différences de la mortalité spontanée et de la mobilité des spermatozoïdes d'un lapin à l'autre et parfois même d'un éjaculat à l'autre sur un même Lapin. Il est donc capital de tenir compte de la mortalité de base et nous avons écarté systématiquement de nos tests les spermés témoignant d'une trop forte mortalité de base, la limite supérieure tolérable ne nous semble pas devoir être supérieure à 25 %.

3) Immunodiffusion

a) L'activité immunitaire du pool a été testée par la technique de double diffusion vis-à-vis des spermés de deux Lapins pris au hasard parmi le lot utilisé pour les autres phases de l'expérimentation. Les quatre arcs de précipitation obtenus avec un des spermés, les cinq obtenus avec l'autre, témoignent d'une bonne immunisation. Cependant la totalité des antigènes spermatiques ne semble pas avoir été impliquée dans

cette immunisation homospécifique produite par le sperme complet. En effet, 9 antigènes ont été mis en évidence par HUNTER et HAFS (1965), MENGE et PROTZMAN (1967) mais en immunisation hétérospécifique.

b) L'action du pool vis-à-vis du liquide séminal seul et des spermatozoïdes isolés a également été recherchée. Les spermatozoïdes lavés deux fois dans du sérum physiologique sont dilués dans un milieu hypotonique durant les 48 heures de la diffusion. Le liquide séminal présente des arcs de précipitation identiques à ceux du sperme complet ; les spermatozoïdes en milieu hypotonique donnent deux lignes de précipitation.

Nous n'avons pu jusqu'ici montrer par la comparaison des positions réciproques des arcs s'il s'agissait ou non d'antigènes identiques à ceux du liquide séminal. Cependant, il est probable que deux lavages ne sont pas suffisants pour éliminer les antigènes séminaux de la surface des spermatozoïdes ; de plus un milieu hypotonique n'est pas suffisant pour obtenir une spermalyse totale.

Quoiqu'il en soit, cette simple étude n'avait pour but que la vérification par une autre méthode de la valeur de l'immunisation par le sperme total ; la présence de 5 arcs de précipitation pour cette immunisation homospécifique le prouve.

Tableau II

ESSAI DE PECONDATION AVEC 50×10^6 SPERMATOZOIDES INCUBES IN VITRO
 AVEC 0,3 ml DE SERUM IMMUN + 3 BOUTTES DE COMPLEMENT.

Lapine n°	Mâle	Mortalité de base (%)	Mortalité après incubation (%)	Nombre de points d'ovulation	Nombre d'oeufs retrouvés	Nombre d'oeufs fécondés	Temps abatage après I.A.
1	E	29	100	11	11	0	29
2	C	8	1	11	11	0	29
3	I	4	98	8	8	0	29h10
4	D	12	93	7	8	0	30
5	B	5	100	13	12	0	29h10
		11,5	96,4	50	50	0	

Tableau III

ESSAI DE FECONDATION AVEC 50×10^6 SPERMATOZOIDES INCUBES IN VITRO
AVEC 0,3 ml DE SERUM NORMAL + 3 GOUTTES DE COMPLEMENT.

lapine n°	Mâle	Mortalité de base (%)	Mortalité incubation (%)	Nombre points d'ovulation	Nombre d'oeufs retrouvés	Nombre d'oeufs fécondés	Intervalle abattage après I.A.	oeufs 2 cellules	oeufs 4 cellules
6	C	8	15	9	9	8	29h	1	8
7	I	4	17	11	11	9	29h30	6	3
8	D	12	8	10	9	8	29h20	1	7
9	B	5	5	13	9	6	29h	6	0
10	A	5	12	8	8	8	29h	1	7
		6,8	11,4	51	46	40		15	25

II.- INFLUENCE DES SERUMS SUR LA FECONDATION

1) Action du sérum antisperme in vitro

L'action du sérum sur les spermatozoïdes empêche totalement la fécondation (tableau II), aucun des 50 ovules retrouvés dans le tractus perfusé 28 à 32 heures après l'insémination artificielle n'est fécondé.

On peut évidemment attribuer cette action inhibitrice au pouvoir cytotoxique du sérum puisque après l'incubation in vitro les spermatozoïdes sont morts dans une proportion de 96,4 % alors que la mortalité de base n'était que de 11,5 % avant.

Nous n'avons jamais retrouvé de spermatozoïdes dans le tractus femelle que ce soit dans le liquide de perfusion des trompes et des cornes utérines ou que ce soit autour des oeufs à l'examen microscopique en coupes sériées. Ceci confirme l'observation de NOYES, ADAMS et WALTON (1959) sur l'impossibilité pour des spermatozoïdes morts de franchir le col utérin.

Etant donné qu'il a été utilisé indifféremment pour l'expérience du sperme provenant de mâles ayant servi pour l'immunisation et du sperme de mâles n'ayant pas servi, on peut conclure que le sérum immun n'a pas de spécificité individuelle.

Les spermatozoïdes morts sont souvent agglutinés par la tête en paquets de 2 à 20 mais l'agglutination à elle seule n'est pas un facteur limitant de la fécondation car le phénomène est identique après incubation avec du sérum normal : agglutinats par la tête en paquets de 2 à 20, sans répercussion sur le taux de fécondation que l'on peut considérer comme normal (voir tableau III

Tableau IV

INFLUENCE SUR LA FECONDATION D'UN SERUM IMMUN INTRODUIT AVEC
DU COMPLEMENT DANS LE VAGIN D'UNE LAPINE AVANT UN ACCOUPLEMENT NORMAL.

Lapine n°	Mâle	Quantité sérum (ml)	Quantité complément (gouttes)	Nombre Points d'ovulation	Nombre oeufs retrouvés	Nombre d'oeufs fécondés	Temps abattage après accouplement
11	C	2,4	24	8	9	0	28h45
12	C	2,4	24	4	2	0	30h20
13	B	1	9	9	10	0	30h
14	D	1	9	9	2	0	29h30
15	H	1	9	10	9	0	30h
16	G	1	9	10	10	0	30h
				50	42	0	

Cette expérience témoin confirme que si le sérum normal agglutine les spermatozoïdes (voir photo) il ne diminue pas significativement la vitalité des spermatozoïdes et n'empêche pas la fécondation, 86,4 % des 46 oeufs retrouvés étant fécondés.

L'adjonction de complément au sérum normal dans les mêmes conditions que pour l'antisérum montre :

- 1- que le SN ne contient pas le facteur cytotoxique qui se trouve dans le sérum de la Lapine immunisée avec du sperme.
- 2- que le facteur cytotoxique est bien lié à l'immunsérum et au complément.

Dans la série témoin, de nombreux spermatozoïdes ont été retrouvés dans le liquide de perfusion des cornes et des trompes ainsi que autour des oeufs examinés en coupes sériées (voir photo).

2) Action du sérum antisperme in vivo

L'influence sur la fécondation de l'introduction dans le vagin de sérum antisperme et de complément est montrée sur le tableau IV : Aucun des 42 oeufs retrouvés n'était fécondé.

Nous avons dans un premier temps introduit une quantité importante de pool et de complément dans le vagin (expérience 11 et 12) reprenant la proportion utilisée dans l'expérience in vitro.: 0,3 ml de pool pour 50 millions de spermatozoïdes. Pour un éjaculat de nos Lapins, 2,4 ml de sérum correspondant à 400 millions de spermatozoïdes devait suffir pour agir dans les mêmes conditions.

Tableau V

INFLUENCE SUR LA FECONDATION D'UN SERUM NORMAL INTRODUIT AVEC
DU COMPLEMENT DANS LE VAGIN D'UNE LAPINE AVANT UN ACCOUPLEMENT NORMAL

Lapine n°	Mâle	quantité sérum (ml)	Quantité complément (gouttes)	Nombre points d'ovulation	Nombre œufs retrouvés	Nombre œufs fécondés	Intervalle abattage accouplement	œufs 2 cellules	œufs 4 cellules
17	F	2,4	24	2	0	0	30h	-	-
18	D	2	18	11	11	7	31h30	-	7
19	B	2	18	5	5	0	30h50	-	-
20	I	1	9	9	8	8	30h10	-	8
21	A	1	9	8	7	7	29h45	-	7
22	C	1	9	9	9	8	29h15	-	8
				44	40	30			30

Nous avons ensuite diminué la quantité de sérum introduite dans le vagin car nous avons obtenu chez les animaux témoins (sérum normal) des chiffres relativement bas de fécondation : 7 fécondés sur 16 (expériences 17 et 18, tableau V).

Pensant que la dilution importante du sperme qui était éjaculé dans plus de 3 ml de liquide pourrait être un facteur limitant au pouvoir fécondant, nous avons réduit la quantité de pool introduite dans le vagin à 1 ml. Avec cette quantité nous avons obtenu des résultats tout à fait satisfaisants.

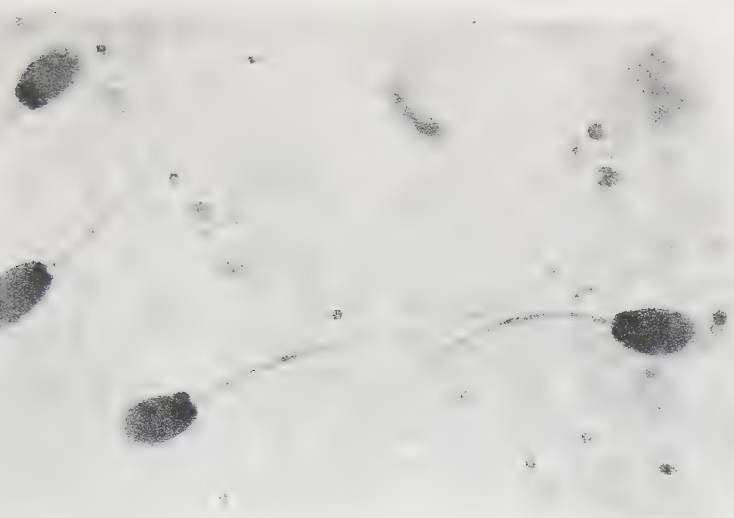
23 oeufs fécondés sur 24 chez les témoins (Expériences 20, 21, 22) tandis que pour la même quantité de pool nous avons une inhibition toujours totale de la fécondation (0 oeufs fécondés sur 31 pour 4 Lapines ; expériences 13, 14, 15, 16) chez les animaux en expérience.

Dans la série expérimentale, nous n'avons jamais retrouvé de spermatozoïdes dans le culot de centrifugation du liquide de perfusion des cornes et des trompes ni autour des oeufs à l'examen histologique.

Au total, l'action de l'immunsérum associé à du complément permet d'inhiber totalement les capacités qu'ont les spermatozoïdes de féconder les oeufs aussi bien in vitro que in vivo.

Lorsque on utilise l'immunsérum, le point d'action se situe localement au niveau même du vagin : aucun spermatozoïde n'est retrouvé dans les cornes ou plus haut dans le tractus génital.

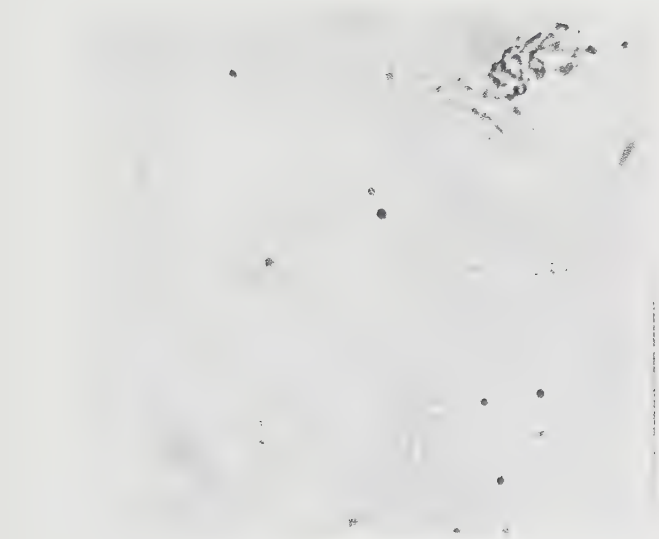
1. Frottis de spermatozoïdes fraîchement éjaculés.
(Coloration: Hémalun-éosine)
2. Frottis de spermatozoïdes après une incubation de 25 minutes dans l'immunsérum pur avec du complément.
(Coloration: Hémalun-éosine)
3. Spermatozoïdes après une incubation de 25 minutes avec un sérum normal + du complément.
4. Gros agglutinat de spermatozoïdes. Incubation dans l'immunsérum dilué au 1/16384.
5. Coupe d'oeuf fécondé. On remarque la présence de spermatozoïdes autour de l'oeuf.
6. Oeufs fécondés par des spermatozoïdes incubés dans un sérum normal avec du complément.



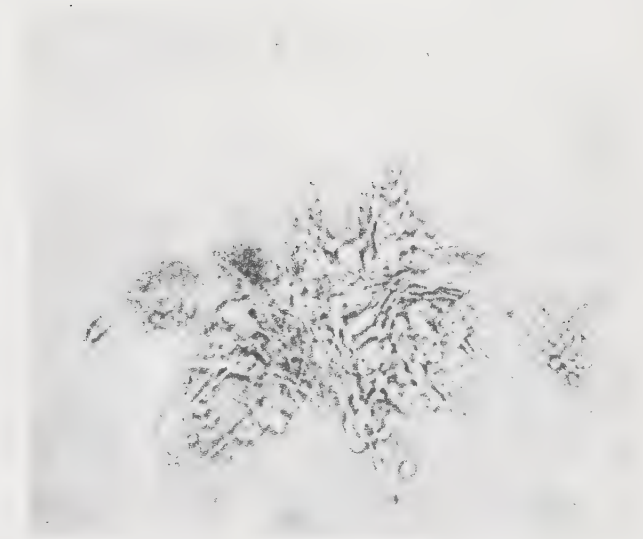
1



2



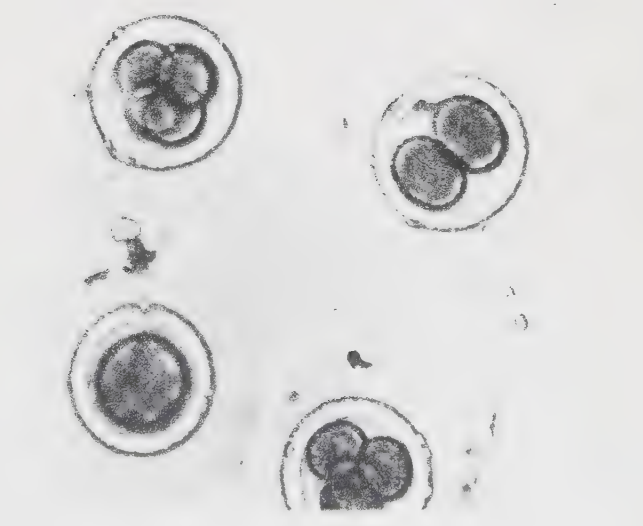
3



4



5



6

A N A L Y S E D E S T R A V A U X A N T E R I E U R S

ANALYSE des TRAVAUX ANTERIEURS

Le nombre des travaux expérimentaux consacrés à l'inhibition de la conception par l'utilisation passive d'un immunosérum antispermatozoïde est très limité. Nous en avons relevé au total 5 qu'il est intéressant d'analyser avant d'aborder la discussion de nos résultats.

I.- PARSON et HYDE (1940)

Ils ont été les premiers à avoir essayé et obtenu l'inhibition de la fécondation par immunisation passive.

- Obtention du sérum : Il s'agissait d'un sérum de Cobaye obtenu par injection intraveineuse et intrapéritonéale de sperme de Lapin. Il semble que l'immunosérum était décomplémenté avant utilisation.

- Test d'activité du sérum : La réaction de fixation du complément était faiblement positive en présence d'extraits de sperme de Lapin.

- Modalité d'action du sérum : Des Lapines fertiles (2 à 5 portées dans les antécédents) recevaient le sérum par voie vaginale en 6 injections de 1 à 1,5 cc. à 2 ou 3 jours d'intervalle puis étaient accouplées naturellement à un mâle fertile 1 à 30 heures après la dernière injection.

- Résultats : Aucune des 9 Lapines de l'expérience n'est devenue gestante après le premier accouplement. 8 devinrent gestantes lors d'un 2^e accouplement pratiqué 36 à 42 jours après le premier et la dernière lors d'un troisième pratiqué 100 jours après le premier.

- Interprétation : Les auteurs se demandent si cette stérilité temporaire est due à la présence d'anticorps dans le sérum ou s'il s'agit d'une propriété du sérum lui-même.

II.- KIDDY, STONE et CASIDA (1959)

Ces auteurs ont étudié l'action d'un sérum bovin antisperme de Lapin sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

- Obtention du sérum : Il a été injecté du sperme de Lapin "poolé" et dilué dans du sérum physiologique à 2 Génisses.

a) L'une a reçu 16,5cc de sperme au total en 11 injections intraveineuses de 1 à 2 ml pendant 77 jours.

b) L'autre a reçu 26,5cc de sperme au total en 7 injections intraveineuses de 3 à 4 ml réparties sur 50 jours.

Le sérum, prélevé une semaine après la dernière injection a été décomplémenté pour éviter les agglutinations non spécifiques, puis conservé à -20° .

- Test d'activité du sérum : Les auteurs ont utilisé un test d'agglutination des spermatozoïdes en distinguant trois sortes :

- tête-tête
- queue-queue
- mixte

Ils ont vu que le type d'agglutination variait avec le sérum utilisé et la dilution.

Avec le sérum normal, ils ont surtout observé des agglutinations par la tête, il y avait quelques agglutinations mixtes dans les faibles dilutions (1/1 à 1/5°). Avec le sérum immun, elles sont beaucoup plus variables : agglutinations par la tête pour des dilutions supérieures au 1/60°, agglutinations mixtes

pour des dilutions plus faibles ($1/30^\circ$ à $1/60^\circ$) et agglutinations par la queue uniquement quand le sérum est pur ou dilué jusqu'à $1/20^\circ$.

D'une manière générale, les auteurs ont constaté que pour une même dilution l'agglutination était toujours plus forte avec l'immunsérum.

- Traitement du sperme et insémination : Le sperme de plusieurs mâles était ramené avec du Kreb's modifié à une concentration de 44×10^6 spermatozoïdes/ml. Une part de cette dilution était incubée 15 minutes à 24°C . avec 2 parts de sérum dilué ; 0,6 ml du mélange était inséminé par voie vaginale à une Lapine, les spermatozoïdes avaient à ce moment une mobilité satisfaisante ; la Lapine recevait en même temps 100 U.I. d'HCG par voie intra-veineuse.

- Résultats :

a) L'influence sur la fécondation (tableau n° 1)
a été appréciée par examen des oeufs 28 heures après l'insémination.

Aucune fécondation n'a été observée quand les spermatozoïdes étaient traités par l'immunsérum dilué au $1/5^\circ$. La fécondation se produisait pour des dilutions supérieures et bien entendu également avec un sérum normal.

Tableau 1

Dilution du sérum	sérum normal		sérum immun	
	Nombre de femelles	taux moyen de fécondat. (%)	Nombre de femelles	taux moyen de fécondat. (%)
1/1	2	36.0	0	
1/5	22	91.5	16	0.0
1/25	0		4	50.4
1/35	7	81.0	8	45.5
1/40	8	93.8	18	56.1
1/60	0		2	68.5
1/70	9	94.9	10	60.4
1/80	23	83.5	38	73.4
1/320	0		3	100.0

% moyen de fécondation pour des échantillons de sperme traités avec différentes dilutions de sérum normal et de sérum immun

(tiré de KIDDY, STONE et CASIDA)

b) L'influence sur la survie embryonnaire a été également étudiée pour les différentes dilutions par comparaison avec le taux de fécondation obtenu à l'expérience précédente. Les animaux dans ce cas étaient abattus au 28ème jour de gestation.

Les auteurs ont observé un effet certain de l'antisérum puisque 23 femelles sur 58 inséminées avec des spermatozoïdes traités par l'immunsérum n'avaient pas de portée contre 3 sur les 59 inséminées avec des spermatozoïdes traités par du sérum normal. De plus chez les femelles traitées et menant leur gestation

jusqu'au terme fixé, ils ont constaté une diminution significative du nombre de foetus par portée. Les auteurs insistent cependant sur une variabilité très importante d'une femelle à l'autre.

- Interprétation : Le mécanisme d'action des anticorps reste inconnu, il est montré qu'il ne semble pas avoir de rapport avec l'agglutination ou la mobilité.

III.- MENGE, STONE, TYLER et CASIDA (1962)

Ce travail qui prolonge le précédent a eu pour but de vérifier chez le Bovin, les faits constatés chez le Lapin, de préciser le rapport des agglutinines antispermatozoïdes avec l'action stérilisante, de tester l'effet d'anticorps antiérythrocytaires.

- Obtention du sérum : Différentes sortes de sérum immun furent utilisées.

- sérum bovin antibovin : obtenu chez une Génisse qui reçoit 3 injections sous-cutanées et 7 injections intraveineuses de sperme entier provenant du même Taureau.

- sérum Lapin antibovin : c'était en fait un pool de sérum provenant de 8 Lapines qui avaient reçu 13 à 14 injections intraveineuses et sous-cutanées de spermatozoïdes lavés de Taureau, réparties sur 6 semaines.

- sérum bovin antilapin : C'était le sérum de la deuxième Génisse de l'expérience précédente (KIDDY et al., 1959).

- sérum bovin antiérythrocytes de Lapin : Obtenu chez une Génisse par 10 injections intraveineuses et 2 sous-cutanées, chaque injection étant de 10 ml d'une suspension de 50 % d'érythrocytes.

Tableau 2

Sérum	Dilution	Nombre de Génisses inséminées	Résultats de l'insémination
Bovin antisperme bovin	1/4	6	5 reviennent en oestrus 1 embryon dégénéré à 42 jours
Sérum normal bovin	1/4	2	2 embryons normaux à 42 jours
Kreb's modifié		2	2 embryons normaux à 14 jours
Lapin antisperme bovin	1/8	6	6 reviennent en oestrus
Lapin antisperme bovin	1/8	3	3 oeufs non fécondés à 3 jours
Sérum normal lapin	1/8	3	2 oeufs fécondés à 3 jours 1 oeuf non fécondé à 3 jours
Lapin antisperme bovin absorbé - avec spermatozoïdes bovin	1/8	2	2 oeufs fécondés à 3 jours
- avec érythrocyte bovin	1/8	2	2 retours en oestrus
- avec érythrocyte bovin	1/8	2	2 oeufs non fécondés à 3 jours
Bovin antiérythrocytaire bovin	2/3	5	5 oeufs fécondés à 3 jours

(tiré de MENGE et al., 1962)

Tableau 3

Sérum (dilution 1/3)	Nombre de Lapins	Nombre d'oeufs		% oeufs fécondés
		récupérés	fécondés	
Sérum normal	4	19	17	89.5
Antisperme de Lapin	4	29	0	0.0
Gamma globuline de sérum normal	3	22	22	100.0
Gamma globuline d'immun sérum	3	27	0	0.0
Immun sérum absorbé avec spermatozoïdes lapin	4	29	20	69.0
Immun sérum absorbé avec érythrocytes lapin	4	32	0	0.0
Antiérythrocytaire de lapin dilué au 1/3	4	36	35	97.2

(tiré de MENGE et al., 1962)

Les sérums étaient prélevés 6 à 7 jours après la dernière injection et ont tous été décomplémentés (30 min. à 56°).

Le sperme et les sérums étaient ramenés à la dilution désirée dans du Kreb's modifié au moment de l'utilisation.

- Modalité d'action

Quand il s'agissait d'une Génisse il était inséminé 30 à 40 millions de spermatozoïdes dans deux ml de mélange. Pour une Lapine, 30 millions de spermatozoïdes dans 0,6 ml de mélange.

- Résultats

a) Effet d'un sérum antispermatozoïdes de bovin :

Les résultats sont portés sur le tableau 2.

Il n'y avait pas de diminution notable de la mobilité des spermatozoïdes après l'incubation.

b) Effet d'un sérum bovin antispermatozoïde lapin

(tableau 3). Ici encore, il n'était pas constaté de diminution de la mobilité des spermatozoïdes après incubation.

Tableau 5

Titres de sérums antispermatozoïdes de Lapin (inverse de la plus haute dilution du sérum donnant une réponse positive)						
Tests	nl	anti-spermatozoïde lapin	anti-érythrocyte lapin	antispermatozoïdes lapin absorbé		sérum lapin normal
				spermatozoïdes lapin	érythrocytes lapin	
Agglutination spermatozoïdes	16	1024	16	0	1024	0
Effet stérilisant	non	oui	non	non	oui	-

(tiré de MENGE et al., 1962)

- Test d'activité du sérum

Les titres d'agglutinines des différents sérums absorbés ou non étaient appréciés par l'étude de l'agglutination des gamètes selon la méthode de Kibrick (1952) avec les sérums antispermatozoïdes et antiérythrocytes bovins (tableaux n° 4 et 5)

Tableau 4

Titres des sérums antispermatozoïdes bovins (inverse de la plus haute dilution du sérum donnant une réponse positive)							
Tests	sérum bovin			sérum lapin			
	nl	antispz.	anti-érythro.	nl	antispz. bovin	antispz. absorbé	bovin
						spz. bovin	érythro. bovin
Agglutination spermatozoïdes	4	128	4	4	32768	0	32768
Effet stérilisant	non	oui	non	non	oui	non	oui

(tiré de MENGE et al., 1962)

Des titres élevés ont été normalement trouvés avec les sérums antispermatozoïdes bovin et lapin.

Des titres très faibles ont été obtenus avec le sérum normal de lapin et de bovin comme avec le sérum antiérythrocytaire bovin. Ceux-ci sont attribués par les auteurs à des anticorps naturels présents dans les sérums et agissant par réactions croisées.

L'absorption de l'immun sérum avec des érythrocytes n'ayant aucun effet sur le taux d'agglutination, alors que l'absorption avec des spermatozoïdes bovins lavés a enlevé complètement les agglutinines spermatiques, les auteurs ont conclu qu'il n'y avait pas d'antigène commun aux spermatozoïdes et aux érythrocytes.

- Interprétation

En comparant l'étude de l'activité des sérums aux résultats obtenus sur la fécondation, les auteurs concluaient que le sérum antispermatozoïdes bovin a un effet stérilisant et que celui-ci est indépendant d'anticorps antiérythrocytaires.

IV.- MENGE et PROTZMAN (1967)

Ces auteurs ont cherché à préciser l'origine des antigènes induisant la production des anticorps qui inhibent la fécondation.

- Obtention du sérum

L'immunsérum était produit par des bovins et des Cobayes qui recevaient du sperme total, des fractions de sperme ou d'autres tissus plus de l'adjuvant de Freund.

Les sérums immuns étaient décomplémentés avant utilisation.

- Tests d'activité du sérum

Différents tests ont été utilisés :

- Test de Kibrick (1952) pour déterminer le titre de spermagglutinine dans le sérum.

- double diffusion sur agar

- Immunoélectrophorèse.

Tous les sérums présentaient des agglutinations à des dilutions élevées sauf le sérum normal bovin et le sérum bovin antisperme de lapin. Les faibles titres d'agglutinine trouvés dans ces deux cas étaient attribués à des réactions croisées dues à des anticorps naturels.

Par immunoélectrophorèse, les auteurs ont trouvé 9 antigènes dans le sperme de lapin dont 6 étaient présents dans le plasma séminal de mâles vasectomisés.

L'immunodiffusion a montré que le testicule apporte deux antigènes au sperme qui semblent être spécifiques du spermatozoïde puisqu'ils étaient présents dans les spermatozoïdes épiddymaires lavés et absents dans le plasma séminal.

- Mode d'action du sérum

Les spermatozoïdes et sérums étaient dilués à la concentration voulue dans une solution de Krebs et après mélange incubés 15 minutes à 37°.

Tableau 6

% de fécondation chez des lapins inséminés avec du sperme, traités par divers sérums bovins					
Sérum	dilution finale	Nombre de lapins	Nombre d'oeufs récupérés	Nombre d'oeufs fécondés	
normal	1/2	8	71	94.4	
antitesticulaire	1/5	4	41	0.0	
antispermatozoïdes	1/5	4	35	0.0	
antisperme éjaculé	1/5	4	34	0.0	
antiplasma séminal	1/2	2	24	91.7	
antiembryon	1/2	4	46	91.4	
anticerveau	1/2	2	20	95.0	
antisérum	1/2	2	13	100.0	
sérum absorbé avec testicule :					
antitesticulaire	1/2	2	16	93.8	
antispermatozoïdes	1/5	2	17	94.1	
épididymaire	1/5	2	22	81.8	
antisperme					
sérum antisperme absorbé avec :					
spermatozoïdes	1/5	2	18	94.4	
épididymaires	1/30	2	19	0.0	
plasma séminal	1/30	2	20	95.0	
surchargeant du sperme	1/30	2	17	0.0	
solution physiologique					
sérum normal (insémination)	1/4	2	9	88.9	
sérum antisperme (tubaire)			12	0.0	

(tiré de MENGE et PROTZMAN, 1967)

Les Lapines étaient inséminées avec 25×10^6 spermatozoïdes dans 0,5 ml du mélange.

- Résultats

Il y avait une inhibition totale de la fécondation lorsque les spermatozoïdes étaient traités par un sérum antitesticulaire, antispermatozoïdes épидидymaires ou antisperme éjaculé (voir tableau n° 6).

L'absorption de cet antisérum avec des extraits testiculaires ou avec des spermatozoïdes épидидymaires supprimait l'effet.

Enfin, les spermatozoïdes traités ($2 \text{ à } 3 \times 10^6$) ont été inséminés directement dans l'oviducte 8 heures après HCG et l'effet inhibiteur de l'antisérum a persisté alors que le sérum n'empêchait pas la fécondation.

Les résultats qui ont été trouvés lorsque les spermatozoïdes étaient incubés avec de l'antisérum de Cobaye ont confirmé ceux obtenus avec de l'antisérum bovin.

- Interprétation

Les résultats montrent que chez le Lapin, les antigènes qui induisent la production d'anticorps capables d'empêcher la fécondation apparaissent dès le niveau testiculaire. L'effet stérilisant est dû à un autre facteur que la simple agglutination des gamètes. S'appuyant sur leurs résultats et les travaux antérieurs, les auteurs pensent que la stérilité peut être la conséquence d'une combinaison de deux facteurs : les anticorps responsables agissant au moment de la fécondation et peut être même plus tard après que le blastocyste ait perdu la zone pellucide.

V.- METZ et ANIKA (1970)

Ces auteurs ont voulu préciser le mécanisme d'action des anticorps responsables de l'inhibition de la fécondation en faisant agir sur les spermatozoïdes une fraction non agglutinante d'anticorps.

- Obtention de l'anticorps

- Immunisation

Un culot de centrifugation de sperme éjaculé de lapin, mélangé à de l'adjuvant complet de Freund, a été administré par voie intramusculaire à des Cobaye.

- Préparation de l'anticorps univalent

Le fragment d'anticorps a été obtenu selon la méthode de digestion par la papaïne de Porter (1959).

La digestion était considérée comme complète quand l'anticorps n'agglutinait plus les spermatozoïdes de Lapin.

- Traitement du sperme et insémination

Les auteurs comparaient l'action de l'anticorps bivalent (non digéré) et univalent (digéré). Ils ont incubé 0,3 ml de sperme de Lapin fraîchement éjaculé avec 1 ml de gammaglobuline digérée ou non à 37° pendant 30 minutes. La mobilité et l'agglutination éventuelles étaient contrôlées puis le mélange inséminé par voie vaginale à une Lapine qui recevait d'autre part 2,5 mg de LH par voie intraveineuse. Les animaux étaient abattus 6 jours après et les oeufs examinés pour contrôler la fécondation.

- Résultats

Les gammaglobulines antisperme digérées ou non par la papaine suppriment les capacités fécondantes du sperme.

Son incubation avec les différents anticorps a donné les résultats suivants :

1) Anticorps digéré (sérum immun)

8 oeufs fécondés et 20 oeufs non fécondés ont été retrouvés pour 48 corps jaunes visibles sur les ovaires (les 8 oeufs provenaient tous de la même Lapine).

2) Anticorps digéré témoin (sérum normal)

40 blastocystes ont été retrouvés pour 36 corps jaunes.

3) Anticorps non digéré (sérum immun)

0 blastocystes et 11 oeufs non fécondés ont été retrouvés pour 43 corps jaunes.

4) Anticorps non digéré témoin :

27 blastocystes ont été retrouvés pour 39 corps jaunes.

Les auteurs ont constaté d'autre part que l'incubation avec l'anticorps n'a pas eu d'influence sur la mobilité et concluent à une inhibition de la fécondation sans agglutination. Pour préciser le mécanisme d'action ils ont recherché le nombre de spermatozoïdes qui sont passés à travers le col en perfusant le tractus à différents niveaux 11-12 heures après l'insémination artificielle. Par rapport au témoin, ils ont trouvé 50 fois moins de spermatozoïdes dans le tractus quand ils sont préalablement incubés avec la fraction d'anticorps active (42 300 en moyenne contre 2 435 200). Ils considèrent que c'est là une explication suffisante à l'inhibition de la fécondation.

- Interprétation

Les auteurs pensent que l'anticorps agit en bloquant une enzyme du sperme nécessaire au passage à travers le mucus cervical.

Le tableau n° VI résume l'ensemble de ces travaux.

Tableau VI

EXPERIENCE D'INHIBITION DE LA FECONDATION PAR IMMUNISATION PASSIVE

CHEZ LES MAMMIFERES

antigène immunisant	animal immunisé	sperme utilisé	type d'incubation	lieu d'insémination	Nombre de spermatozoïdes	résultats oeufs fécondés	Auteurs
sperme éjaculé de lapin	cobaye	lapin	intra-vaginal	-	-	0 gestation	PEARSONS, HYDE (1940)
sperme éjaculé de lapin	génisse	lapin	$\frac{\text{in vitro}}{15' - 24'}$	vaginal	15×10^6	0/16	KIDDY, STONE CASIDA (1959)
sperme éjaculé de taureau	génisse	taureau	$\frac{\text{in vitro}}{30'}$	vaginal	$30-40 \times 10^6$	embryon dégén./6 insémin.	MENGE
sperme éjaculé de taureau	lapin	taureau	$\frac{\text{in vitro}}{30'}$	vaginal	$30-40 \times 10^6$	Ogestation /9	et al (1962)
Sperme de Lapin	génisse	lapin	$\frac{\text{in vitro}}{15'}$	vaginal	30×10^6	0/29	
Sperme de taureau	lapin	gamma-glob.				0/27	
Testicule Spz.épididymaire Spz.éjaculé	Génisse	éjaculé poolé	$\frac{\text{in vitro}}{15' - 37'}$	vaginal	25×10^6	0/41 0/35 0/34	
Testicule spz.épididymaire spz.éjaculé	cobaye	éjaculé poolé	$\frac{\text{in vitro}}{15' - 37'}$	vaginal	25×10^6	0/19 0/42 0/21	MENGE, PROTZMAN (1967)
spz.éjaculé lapin		éjaculé lavé	$\frac{\text{in vitro}}{15' - 37'}$	oviducte	$2 \text{ à } 3 \times 10^6$	0/12	
Spz.éjaculé lapin centrifugé	cobaye	lapin éjaculé	$\frac{\text{in vitro}}{30' - 37'}$	vaginal		0/43	METZ ANIKA (1970)

DISCUSSION

DISCUSSION

Avant d'aborder l'analyse critique de nos résultats expérimentaux il n'est pas inutile de discuter les résultats obtenus dans la série témoin qui peuvent paraître en contradiction avec certains travaux antérieurs.

I.- ANALYSE DES RESULTATS DE LA SERIE TEMOIN

Dans notre série, l'incubation in vitro dans du sérum normal de lapin n'a pas augmenté de manière importante la quantité de spermatozoïdes morts (11,4 % contre 6,8 %) et n'a pas supprimé leur capacité fécondante (86,9 % des oeufs retrouvés sont fécondés). Il est intéressant de comparer ces résultats à ceux de CHANG (1947).

Cet auteur a montré que le sérum frais humain, bovin, lapin, de cobaye et de rat, contient un facteur qui tue les spermatozoïdes homologues (sauf dans le cas de l'homme) et les spermatozoïdes hétérologues.

Ceci peut se comprendre pour les sérums hétérologues, mais se comprend moins aisément pour les sérums homologues, et nos résultats apparaissent contradictoires à ceux de CHANG tout au moins quant au lapin.

Afin d'expliquer cette différence, nous allons analyser plus précisément les conditions expérimentales de CHANG.

1) Quantité de sérum employée

CHANG mettait en présence 1 goutte de sperme frais ($3 \text{ à } 9 \times 10^6$ spermatozoïdes en moyenne) avec 1 ml de sérum et constatait que tous les spermatozoïdes étaient morts. Il estime que 0,1 ml de sérum tue $1,2 \text{ à } 1,6 \times 10^6$ spermatozoïdes. En augmentant la quantité de spermatozoïdes; l'effet toxique disparaissait.

Comme nous avons incubé 0,3 ml de sérum avec 50×10^6 spermatozoïdes, on peut penser que l'éventuel facteur spermicide était en trop petite quantité dans notre technique pour avoir encore une activité.

2) Traitement du sérum avant utilisation

Notre sérum normal a été chauffé à 56°C après recueil et conservé à -35° , alors que CHANG utilisait un sérum frais, il a montré d'autre part que l'activité était perdue au bout de 4 à 7 jours quand on stockait le sérum à 4° ou à la température ambiante, et quand on le chauffait à 57°C pendant 5 à 10 minutes.

Par l'action de ce dernier traitement (qui est le notre), on peut penser que le facteur détruit est une protéine et qu'il s'agit du complément. Cette hypothèse a été soulevée et étudiée par CHANG. Il a montré que si le facteur spermicide est thermolabile et instable, s'il est en quantités variables selon les individus et les espèces, par contre, le cholestérol, le kaolin, le chloroforme, l'éther ou l'alcool qui inactivent le complément n'ont pas d'effet sur le facteur spermicide.

CHANG concluait donc qu'il ne s'agissait pas de complément et l'expérience présentée ici, confirme ce point de vue puisque nous avons ajouté systématiquement du complément au sérum normal et qu'aucune activité spermicide n'a été constatée.

Au total : L'apparente opposition des résultats de CHANG et des nôtres résulte simplement de conditions expérimentales différentes. On peut même avancer qu'ils sont en fait complémentaires.

La diminution du taux de fertilité constatée quand 3 ml de sérum sont introduits dans le vagin ne serait pas due à un facteur spermicide mais plutôt à la dilution des spermatozoïdes dans le volume important de sérum et de complément. On sait déjà qu'une dilution trop importante des spermatozoïdes dans l'oviducte diminue le taux de fécondation chez la Lapine (OVERSTREET, 1970).

II.- DISCUSSION DES RESULTATS DE LA SERIE EXPERIMENTALE

L'action régulièrement inhibitrice de l'immunsérum soulève deux questions essentielles.

- Quelle est la fraction active de l'immunsérum ?
- A quel niveau agit-il ?

1) Fraction active de l'immunsérum

Le sérum obtenu par immunisation avec du sperme total est complexe. Les antigènes qui induisent la fabrication des anticorps peuvent être classés en 3 catégories.

a) Les antigènes du liquide séminal

Ils sont nombreux mais ne semblent pas pouvoir jouer un rôle dans l'inhibition de la fécondation (MENGE et PROTZMAN, 1967).

b) Les antigènes propres au spermatozoïde

Bien qu'ils soient difficiles à mettre en évidence, on est arrivé à dénombrer 2 antigènes spermatiques propres au spermatozoïde (HUNTER et HAFS, 1965 ; HUNTER, 1969 ; MENGE et PROTZMAN, 1967). D'après ces derniers auteurs, il est probable que ce soient ces antigènes qui induisent la fabrication des anticorps qui inhibent la fécondation. Ils ont en effet montré que l'absorption de l'immunsérum avec des spermatozoïdes supprime son efficacité.

c) Les antigènes fixés sur la membrane du spermatozoïde

En dehors des antigènes qui lui sont propres, le spermatozoïde est couvert de matériel antigénique d'origine séminal (WEIL et RODENBURG, 1962). Il forme ce qu'on appelle les "sperm coating antigens" (SCA). HUNTER (1969) en décrit 12, 2 venant des sécrétions testiculaires, 2 du fluide épидидymaire et 8 des organes qui s'abouchent dans les voies excrétrices après le canal déférent.

Sans être aussi affirmatif que pour les antigènes spécifiques du gamète, on peut penser que les "SCA" jouent un rôle dans l'inhibition de la fécondation.

HUNTER et NORNES (1969) ont montré qu'un "SCA" originaire du plasma séminal peut empêcher la fécondation et ils comparent cet antigène au facteur de décapacitation décrit par BEDFORD et CHANG (1962).

Si on ne peut pas dire quels sont le ou les antigènes responsables de l'action inhibitrice, on ne connaît pas plus la fraction immunoglobulinique active du sérum ; seuls METZ et ANIKA (1970) ont rapporté une expérience positive avec un fragment d'IgG : la fraction Fab (3,5 S) obtenue par digestion par de la papaine d'un anticorps normal 7S.

Pour le moment il est impossible de déterminer exactement quelle est la fraction active de l'immunsérum et la spécificité de l'anticorps ou des anticorps inhibiteurs de la fécondation. La confrontation des travaux antérieurs et du nôtre permet seulement de différencier l'activité de l'immunsérum en fonction de son mode d'action jugé au travers des tests immunologiques employés.

a) Les anticorps précipitants

L'analyse de l'antisérum par immunodiffusion ou immunoélectrophorèse permet de mettre en évidence un certain nombre d'anticorps précipitants. Il n'agissent vraisemblablement pas pour inhiber la fécondation. Seule réserve : un anticorps en se liant à un antigène absorbé de surface et en modifiant la couche protéique péricellulaire pourrait intervenir.

b) Les anticorps agglutinants

L'agglutination des spermatozoïdes est un phénomène très courant : Elle peut se produire spontanément dans certains

éjaculats, on l'observe chez le Lapin quand on incube le spermatozoïde dans du sérum physiologique ou du sérum normal. Elle se produit généralement par la tête. Certains auteurs (KIDDY et al., 1959 ; EDWARDS, 1960) ont décrit les agglutinations par la queue lorsque des spermatozoïdes sont incubés dans un sérum immun.

Le taux d'agglutinine a souvent été considéré comme un bon test pour apprécier la valeur d'un sérum mais il ne semble pas y avoir de rapports entre l'agglutination et l'inhibition de la fécondation (KIDDY et al., 1959 ; MENGE et PROTZMAN, 1967 ; METZ et ANIKA, 1970).

Nous mêmes avons également obtenu des fécondations après incubation dans du sérum normal qui agglutinait des spermatozoïdes.

Il conviendrait sans doute de distinguer les agglutinations irréversibles empêchant la fécondation peut-être par entrave à la mobilité du spermatozoïde et les agglutinations réversibles dans les voies génitales femelles. Ce point précis des différences d'aptitude à la fécondation en fonction de la nature réversible ou non de l'agglutination n'a pas été étudié. Mais, un travail de YANAGIMACHI (1969) apporte un argument indirect à l'hypothèse émise : dans son étude de la capacitation et de la fécondation in vitro chez le Hamster, il a observé que le liquide folliculaire, qui a une composition proche de celle du sérum, agglutinait les spermatozoïdes. Au bout d'un certain temps, les agglutinats disparaissent en même temps qu'apparaît l'aptitude à la fécondation.

Dans le cas où il y a inhibition de la fécondation par un sérum agglutinant, on peut se demander si c'est l'agglutination en elle-même et l'entrave à la mobilité qui agissent ou si la fixation d'un fragment d'anticorps sur la membrane du spermatozoïde bloque un site nécessaire à la remontée du gamète comme le suggèrent METZ et ANIKA (1970).

c) Les anticorps immobilisants

Ils furent parmi les premiers connus puisque METCHNIKOFF les décrivait déjà en 1900 : par immunisation d'un Cobaye avec des extraits testiculaires de Lapin, il obtenait "... une spermotoxine artificielle qui immobilise les spermatozoïdes de Lapin au bout de peu de minutes ...". Il faut souligner qu'il utilisait du sérum non décomplémenté.

EDWARDS (1960) dans son étude du sérum antisperme de Lapin retrouve aussi les anticorps immobilisant et confirme que leur action est liée à la présence de complément.

Nous pensons que ces anticorps immobilisants sont les mêmes que les anticorps cytotoxiques mis en évidence dans notre expérience. En effet aucun test de cytotoxicité n'a été appliqué par ces auteurs.

Comme pour les immobilisants, l'action des anticorps cytotoxiques est liée à la présence de complément ; on est donc amené à discuter le rôle de ce dernier.

Il paraît essentiel, non pas en tant que tel, puisque adjoint au sérum normal dans nos séries témoins, il n'a pas empêché la fécondation, mais par son action combinée avec

l'immunsérum qui aboutit à des lésions de la membrane plasmique. Cette action couplée permet également de déduire que c'est la fraction IgG du sérum qui est active.

Ce point mérite une vérification que nous avons entreprise.

2) Niveau d'action de l'immunsérum

Dans notre expérience on peut affirmer que l'action cytotoxique de l'immunsérum s'exerce spécifiquement et exclusivement sur la gamète mâle.

Cette action est déjà constante in vitro, le test de cytotoxicité prouvant la mort de 100 % des spermatozoïdes avec les doses d'immunsérum que nous avons employées.

Dans les expériences avec dépôt intravaginal, bien que nous ne l'ayons pas vérifié, on peut penser qu'il en est de même, d'ailleurs la recherche systématique des spermatozoïdes dans les perfusats des cornes utérines et d'oviductes de Lapines immunisées a toujours été négative.

On sait d'ailleurs que les spermatozoïdes morts ne franchissent pas le col (NOYES, WALTON, ADAMS, 1959).

S'il apparaît certain que le niveau d'action de l'immunsérum est vaginal, cela implique une très grande rapidité d'action car on sait que les spermatozoïdes éjaculés passent immédiatement dans le col et sont retrouvés 20 minutes après l'accouplement dans les cornes utérines (HAMMOND, 1934 ; FLOREY, WALTON, 1932). D'ailleurs dans un cas, au moment de la prise des

chaleurs, une de nos lapines a été couverte contre notre volonté. Nous avons alors introduit l'antisérum 15 minutes après et nous avons trouvé dans les voies génitales 6 oeufs fécondés sur 11. Il est vraisemblable qu'au moment de l'introduction du sérum antisperme un certain nombre de spermatozoïdes étaient passés dans le col et se trouvaient ainsi à l'abri de l'immunsérum resté dans le vagin.

Enfin, s'il est acquis que l'immunsérum agit directement sur les spermatozoïdes, quelle est la lésion provoquée à l'échelon cellulaire ?

BEDFORD (1970) a montré par des études en microscopie électronique que le spermatozoïde de lapin exposé à du sérum frais homologue présente une membrane plasmique et la membrane externe de l'acrosome rompus. Comme CHANG (1947) BEDFORD utilisait du sérum frais.

Nous ne savons pas si le sérum immun utilisé dans nos conditions donne les mêmes lésions et nous n'avons pu étudier pour notre part les modifications morphologiques du spermatozoïde traité en microscopie électronique. La rapidité de l'action du sérum in vivo plaide en tous cas en faveur d'une intervention au niveau de la membrane cellulaire.

Au total

Nous ne pouvons pas savoir actuellement de façon précise quel est le fragment d'anticorps et les antigènes en cause, par contre les résultats permettent de situer exactement le niveau d'action qui est strictement localisé au spermatozoïde. Mais le

mode d'action à l'échelon cellulaire et en particulier les modifications responsables de la mort instantanée du spermatozoïde restent à préciser.

Malgré les incertitudes notre travail établit bien formellement que le sérum homologue antisperme de Lapin, auquel on ajoute du complément peut agir spécifiquement sur le gamète mâle à un niveau très précis avec une très grande rapidité et de manière irréversible. Il donne, quant à l'effet recherché l'inhibition de la fécondation des résultats très constants et absolus.

CONCLUSION

C O N C L U S I O N

La connaissance du caractère antigénique des spermatozoïdes a été à l'origine, dès le début de ce siècle, de l'espoir de contrôler la fertilité par une méthode immunologique. Aussi les travaux expérimentaux ont-ils été nombreux sur ce thème tout au long des soixante dix dernières années.

En analysant la littérature, on constate que la plupart des tentatives ont utilisé une immunisation active de la femelle ; le succès a été inégal selon les modalités protocolaires, il paraît néanmoins acquis que cette technique peut rendre une femelle stérile temporairement. Mais le pas de l'application clinique n'a pratiquement jamais été franchi, tant apparaissent grandes d'emblée les difficultés et les risques d'une telle méthode.

Les expériences d'immunisation passive ont été beaucoup plus rares et on ne peut que s'en étonner si l'on considère leurs différents avantages : - d'une part elles ne font intervenir que les anticorps humoraux et permettent ainsi une étude in vitro avec possibilité d'apprécier la spécificité et le mécanisme d'action des anticorps ; - d'autre part, elles se prêteraient à une éventuelle application pratique simple par voie intravaginale.

Le travail présenté ici entre dans cette deuxième catégorie. Nous avons étudié l'action in vitro et intravaginale (in vivo) d'un sérum immun homologue sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes de Lapin. Quelques études avaient déjà été consacrées à l'action in vitro d'un immunsérum ; une seule, très fragmentaire, avait abordé le problème in vivo.

Nous avons introduit par rapport à ces travaux une modification fondamentale : l'adjonction de complément. Nous avons ainsi utilisé le pouvoir cytotoxique du sérum ; ce pouvoir étant évalué dans des conditions précises par un test d'exclusion d'un colorant vital.

Dans les conditions de notre expérimentation, aussi bien in vitro qu'in vivo la fécondation a été nulle chaque fois que les spermatozoïdes ont été mis en présence de l'immunsérum, alors qu'un sérum normal aux doses employées n'inhibait que peu ou pas du tout la fécondation.

Le sérum immun agit évidemment en tuant les spermatozoïdes grâce à la présence de complément. Le fait que nous n'ayons jamais retrouvé les spermatozoïdes dans l'utérus ou l'oviducte des Lapines traitées confirme le niveau vaginal de l'action du sérum in vivo.

Ces faits présentent un grand intérêt dans une perspective d'application pratique ; il faut cependant être conscient de ce qui nous sépare encore de ce but.

Nous avons ici utilisé un sérum homologue. En cas d'application humaine, c'est bien entendu à un sérum hétérologue qu'il faudra recourir. A priori d'ailleurs son action ne devrait qu'en gagner en efficacité.

D'autres éléments font l'objet actuellement d'une étude particulière tels que l'identification de la fraction globulinique active ou la durée d'action du sérum in vivo après introduction vaginale.

Dès maintenant il apparaît que l'action cytotoxique d'un sérum immun antisperme supprime la capacité récondante des spermatozoïdes ; la démonstration expérimentale de son efficacité par voie vaginale fait entrevoir la possibilité d'une application pratique constituant une solution nouvelle dans le domaine de la contraception.

BIBLIOGRAPHIE

B I B L I O G R A P H I E

- BEDFORD J.M., 1970. Sperm capacitation and fertilisation in mammals. *Biol. Reprod.* 2, suppl.2, 128-158.
- BEDFORD J.M., CHANG M.C., 1962. Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *Am. J. Physiol.*, 202, 178-181.
- CHANG M.C., 1947. The effects of serum on spermatozoa. *J. Gen. Physiol.*, 30, 321-355.
- EASLEY G.T., MAYER D.T., BOGART R., 1942. Influence of diluters, rate of cooling and storage temperatures on survival of bull sperm. *Amer. J. Vet. Res.*, 3, 358.
- EDWARDS R.G., 1960. Complement fixing activity of normal rabbit serum with rabbit spermatozoa and seminal plasma. *J. Reprod. Fert.*, 1, 268-282.
- EMMENS C.W., 1947. The motility and viability of rabbit spermatozoa at different hydrogen-ion-concentrations. *J. Physiol.*, 106, 471.
- ENGELFRIET C.P., BRITTON A., 1965. A cytotoxic test for leucocytes antibodies. *Vox. Sang* 10, 660.
- FLOREY H., WALTON A., 1932. Uterine fistula used to determine the mechanism of ascent of the spermatozoa in the genital tract. *Proc. Physiol. Soc.*, J. 74.
- GREGORY P.L.S., 1930. The early embryology of the rabbit. *Contrib. Embryol. Carnegie Int.*, 21, 141.

- HAMERLYNCK J., RUMKE P., 1968. A test for the detection of cytotoxic antibodies to spermatozoa in man. J. Reprod. Fert., 17, 191-194.
- HAMMOND J., 1934. The fertilization of rabbit ova in relation to time. A method for controlling the litter size, the duration of pregnancy and the weight of the young at birth. J. Exp. Biol., 11, 140-161.
- HUNTER A.G., 1969. Differentiation of rabbit sperm antigens from these of seminal plasma. J. Reprod. Fert., 21, 279-288.
- HUNTER A.G., HAFS H.D., 1965. Differentiation of sperm protein from that of seminal plasma in rabbits. Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol., 24, 700.
- HUNTER A.G., NORNES H.O., 1969. Characterisation and isolation of a sperm coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization. J. Reprod. Fert., 20, 419-427.
- KIBBRICK S., BALDING D.L., MERRILL B., 1952. Methods for the detection of antibody against mammalian spermatozoa. Fertil. and Steril., 3, 419.
- KIDDY C.A., STONE W.H., CASIDA L.E., 1959. Immunological studies on fertility and sterility : II- Effects of treatment of semen with antibodies on fertility in rabbits. J. Immunol., 82, 125.
- LANDSTEINER K., 1899. Zum Kenntreis der spezifisch auf blutkörperchen wickendensera. ZSP Bakl. 25, 546.

MENGE A.C., STONE W.H., TYLER W.J., CASIDA L.E., 1962.

Immunological studies on fertility and sterility. IV-
Fertility of cattle and rabbits inseminated with serum
treated with antibodies produced against semen, sperma-
tozoa and erythrocytes. J. Reprod. Fert., 3, 331.

MENGE A.C., PROTZMAN W.P., 1967. Origin of the antigens in
rabbit semen which induce antifertility antibodies.

J. Reprod. Fert., 13, 31-40.

METCHNIKOFF E., 1960. Recherches sur la spermatoxine et l'anti-
spermatoxine. Ann. Inst. Past., 14, 1-12.

METZ C.B., ANIKA J., 1970. Failure of conception in rabbits
inseminated with non agglutinating, univalent antibody-
treated semen. Biol. Reprod., 2, 284-290.

NOYES R.W., ADAMS C.E., WALTON A., 1959. The transfert of ova
in relation to the dosage of oestrogens in ovariectomized
rabbits. J. Endocrin., 18, 108-117.

OBERSTREET 1970. Sperm number and fertilization in the rabbit.
J. Reprod. Fert., 21, 279-288.

PARSONS E.I., HYDE R.R., 1940. An evaluation of spermatotoxic
sera in the prevention of pregnancy. Am. J. Hygien.
Section B, 31, 89.

PORTER R.R., 1959. The hydrolysis of rabbit gamma-globuline
and antibodies with crystalline papain. Biochem. J., 72
119-126.

TYLER A., 1961. Approachs to the control of fertility based
on immunological phenomena. J. Reprod. Fert., 2, 473-
506.

WEIL A.J., RODENBURG J.M., 1962. The seminal vesicle as the source of the spermatozoa coating antigen of seminal plasma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 109, 567.

YANAGIMACHI R., 1969. In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. J. Exp. Zool., 170, 269-280.

